

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐藤 大輔

横浜市立大学大学院医学研究科

審 査 員

主 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 梅 村 敏

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 五 嶋 良 郎

副 査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 矢 尾 正 祐

論文名 ; aPKC λ は nephrin の細胞膜輸送制御を介し、腎糸球体スリット膜の構造、機能維持を担う

論文内容の要旨

腎臓がその血液濾過機能を発揮する上で、スリット膜と呼ばれる、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）間に形成される濾過膜がその中心的な役割を担う。近年、スリット膜を構成するタンパク質の細胞膜局在の減少が、糸球体疾患の発症、進行と密接に関連することを示す知見が相次いで得られており、スリット膜の構造、機能の維持に対するスリット膜タンパク質の細胞膜局在制御の重要性が示唆されている。しかし、スリット膜タンパク質の細胞膜への局在化の動態と、その制御に関わる分子機構については未だ理解が進んでいない。

aPKC (atypical protein kinase C) は、進化的に保存された細胞極性制御タンパク質である。これまでに、aPKC は細胞間接着構造の構成タンパク質や、細胞膜表面受容体の膜輸送制御に関わることが示されている。また、我々はこれまでに、ポドサイト特異的 aPKC λ 欠損マウス（以下、aPKC λ -cKO マウスと記す）がスリット膜の構造異常に起因する重篤なタンパク尿、糸球体硬化症を呈すること、aPKC がスリット膜タンパク質である nephrin、podocin 複合体を形成することを報告している。これらの知見は、aPKC がスリット膜タンパク質の細胞膜局在制御を介し、スリット膜の維持に必須の役割を果たすことを示唆している。本研究では、スリット膜タンパク質の細胞膜への局在化の動態、並びにその制御に対する aPKC の関与について解析した。

まず、ラットより単離した糸球体を用い、スリット膜タンパク質の細胞膜局在と、エンドサイトーシス及び分解の速度について解析を行った。単離糸球体の 37°C、5 分間の培養により細胞膜に局在するスリット膜タンパク質の 5~7 割がエンドサイトーシスを受けた。また、37°C、30 分間の培養により、細胞表面に局在するスリット膜タンパク質の 3~4 割が分解を受けた。一方で、37°C、1 時間の培養ではスリット膜タンパク質の細胞膜局在は一定に保たれていた。急速なエンドサイトーシス、分解が起きているにも関わらず、スリット膜タンパク質の細胞膜局在は一定に保たれていたことより、スリット膜タンパク質の細胞膜局在はその急速な代謝回転、即ち新規合成、エキソサイトーシス、エンドサイトーシス、分解によって制御されることを明らかとした。

次に、スリット膜タンパク質の細胞膜への局在化に対する aPKC の関与について検討した。単離糸球体及び nephrin を安定発現する培養細胞に対する aPKC の活性、発現抑制に伴い、nephrin を始めとするスリット膜タンパク質の細胞膜局在は顕著に減少した。また、nephrin の発現誘導系に対する aPKC の活性抑制に伴い、新規合成された nephrin のエキソサイトーシスが抑制された。一方、aPKC の活性抑制は nephrin のエンドサイトーシスには影響を与えなかった。更に、aPKC λ -cKO マウスにおいては、コントロールマウスと比較して、スリット膜タンパク質の細胞膜局在の顕著な減少、及び小胞体型 nephrin の蓄積が認められた。また、STED 顕微鏡及び免疫電顕を用いた解析においても、aPKC λ -cKO マウスにおけるスリット膜タンパク質の細胞膜局在の減少が認められた。以上から、aPKC はエキソサイトーシス制御を介し、スリット膜タンパク質の細胞膜局在の維持を担うことを明らかとした。

本研究において、スリット膜はその構成タンパク質の急速な代謝回転により制御されることを明らかにした。更に、aPKC がエキソサイトシス制御を介し、スリット膜タンパク質の細胞膜局在の維持に必須の役割を果たすことを解明した。上述したように、スリット膜タンパク質の細胞膜局在の減少が、糸球体疾患の発症、進行と密接に関連することが推測されている。現時点では不明な点が多く残されている糸球体疾患の発症、進行機序について、aPKC を始めとするスリット膜タンパク質の代謝回転制御を担う分子に着目して解析を進めていくことで、糸球体疾患の病態理解や、新規の創薬標的の発見に繋がる可能性がある。

2014年5月19日（月）に行われた審査会においては、まず矢尾副査より以下の質問がなされた。

1. 今回の発表では、スリット膜タンパク質の半減期は30分～40分と非常に短いことが示されていた。一般的の細胞の細胞膜タンパク質の半減期はどの程度なのか。
2. スリット膜タンパク質の急速なターンオーバーの生理的意義は何か。
3. スリット膜の主要な機能は、血清アルブミンの尿中への漏出の防止であると考えられるのか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 増殖因子受容体のような、シグナル伝達に関与する膜タンパク質の半減期は比較的短く、1～2時間程度であることが報告されている。一方、細胞間接着を形成するような構造タンパク質の半減期は、より長時間であると考えられている。
2. スリット膜は血清タンパク質の尿中への漏出を防ぐ物理的障壁として考えられている。故に、血液濾過に伴いスリット膜が血清タンパク質により目詰まりを起こすことは容易に想像できる。スリット膜タンパク質の急速なターンオーバーは、スリット膜の構造を破壊することなく目詰まりを解消するという点で極めて重要であると考えている。
3. スリット膜の構造異常により大量のアルブミンが尿中に漏出することより、スリット膜の主要な機能は血清アルブミンの尿中への漏出防止にあると考えられる。

次に、五嶋副査より以下の質問がなされた。

1. ポドサイトにおける細胞膜タンパク質のターンオーバーの特異性並びに他の上皮細胞系との共通性について論じよ。
2. 先天性糸球体疾患におけるスリット膜タンパク質の変異から、そのタンパク質の機能、またターンオーバー機構について類推することは可能か。
3. nephrin 以外に、スリット膜の機能発揮に重要なタンパク質は存在するか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. 特異性として、スリット膜タンパク質の構成タンパク質が他の上皮細胞の細胞間接着構造と異なる点、共通点として、aPKC λ 、 β -arrestin2、CIN85、Src kinase といったその他の上皮細胞にも普遍的に発現しているタンパク質がスリット膜タンパク質のターンオーバーを制御する点がそれぞれ挙げられる。
2. スリット膜の主要な構成因子である nephrin、podocin のミスセンス変異に伴い、変異 nephrin

が小胞体、ゴルジ体に蓄積し、細胞膜への局在が抑制されるといった知見が複数報告されている。これらの変異体の特性を解析し、野生型との比較を行うことで、スリット膜タンパク質のターンオーバー制御に関わる分子機構の解明に繋がると考えている。

3. 先天性糸球体疾患の原因遺伝子の探索や、ノックアウトマウスを用いた解析から、スリット膜の構造、機能の維持に必須の役割を果たすタンパク質が多数同定されている。

最後に、梅村主査より以下の質問がなされた。

1. nephrin をはじめとするスリット膜タンパク質の急速なエンドサイトーシスを制御するメカニズムについて、どの程度の知見が得られているか。またエキソサイトーシスについてはどうか。
2. ポドサイトにおける insulin signaling と aPKC 活性化、スリット膜タンパク質のエキソサイトーシスとに関連はあるか。
3. 糸球体疾患の治療薬として現在用いられている ARB (angiotensin receptor blocker) やステロイドはスリット膜タンパク質のターンオーバー制御に関係すると考えられるか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1. β -arrestin2、PKC α 、CIN85、Notch、Src kinase 依存的な nephrin のチロシンリン酸化が、nephrin のエンドサイトーシスを惹起することが報告されており、これらの分子が nephrin の急速なエンドサイトーシスを制御していると考えられる。一方、nephrin を始めとするスリット膜タンパク質のエキソサイトーシスの制御機構に関しては、未だ殆ど知見が得られていない。
2. aPKC は筋細胞や脂肪細胞において、insulin シグナルの下流で活性化することが報告されている。故に、ポドサイトにおいても aPKC が insulin シグナルにより活性化し、スリット膜タンパク質のエキソサイトーシスを制御する可能性は十分に考えられる。
3. ARB は酸化ストレスの発生を抑制することで、ポドサイトに対する保護作用を発揮することが報告されており、その結果としてスリット膜タンパク質のターンオーバーが改善することは十分に考えられる。スリット膜タンパク質のターンオーバーに対するステロイドの作用に関しては未だ不明であり、今後の解析が待たれる。

この他にもいくつかの質問がなされたが、いずれも適切な回答がなされた。

以上の審査から本研究は、aPKC λ が nephrin の細胞膜輸送制御を介し、腎糸球体スリット膜の構造、機能維持を担うことを解明した重要な研究であると考えられ、博士（医学）の学位に値するものと判断された。